DOI:10.11931/guihaia.gxzw201802015

百合鳞茎发育过程中淀粉合成相关酶基因的克隆及表达分析

张进忠[1,2]，孙嘉曼[2]，李朝生[2]，韦莉萍[2]，范燕萍[1*]

（1.华南农业大学，林学与风景园林学院，广州 510642；2.广西农业科学院生物技术研究所，南宁 530007）

摘　要：淀粉合成相关酶对于百合鳞茎淀粉的积累、鳞茎的膨大发育具有重要作用；对淀粉合成相关酶基因进行研究，探索基因表达调控模式对于百合鳞茎种球生产具有积极意义。通过同源克隆技术克隆腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGPase）、颗粒结合淀粉合酶（GBSS）和可溶性淀粉合酶（SSS）3 类百合淀粉合成关键酶基因，分析这 3 类淀粉合成关键酶基因的表达变化；并测定百合鳞茎膨大发育中淀粉含量变化。结果表明：（1）*AGPase* 具有 GlgC 家族蛋白 PLN02241 蛋白结构特征及 cl11394 家族蛋白 ADP_Glucose_PP 与 NTP_transferase 结构域，获登录号 KP751443；*GBSS* 与 *SSS* 具有 cl10013 家族蛋白 Glyco_transf_5，GT1_Glycogen_synthase_DULL1_like 结构域，获登录号分别为 KP751444、KP751445。（2）百合鳞茎形成与膨大发育过程中，淀粉含量呈现递增趋势，鳞茎盘开始分化茎杆时其淀粉含量最高，达到 44.52%。鳞茎与叶片部位的三个淀粉合成相关酶基因表达量均逐渐增加；在鳞茎膨大后茎杆分化阶段，三个淀粉合成相关酶基因表达量达到最高，*AGPase*、*GBSS*、*SSS* 在鳞片中的表达量分别为 10.79，6.92 和 5.12，叶片中的表达量分别为 6.79，5.22 和 4.41，鳞片中的表达量大幅度高于叶片；淀粉合成相关酶基因的表达量变化与淀粉含量、鳞茎的膨大发育成正相关。该研究结果为鳞茎的繁殖生产提供了可通过调节淀粉合成关键酶基因表达促进百合鳞茎膨大发育的思路。

关键词：百合，淀粉合成，鳞茎膨大，腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶，荧光定量 PCR

中图分类号：Q786　　　文献标识码：A

Gene expression of starch synthesis-related enzymes during the bulblet development of *Lilium*

ZHANG Jinzhong[1,2], SUN Jiaman[2], LI Chaosheng[2], WEI Liping[2], FAN Yanping[1*]

（1. *College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University*, Guangzhou 510642, China; 2. *Institute of Biotechnology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences*, Nanning 530007, China）

Abstract: Starch synthesis-related enzymes are the key enzymes in the pathway of starch synthesis and metabolism, which plays an important role in the accumulation of starch in lily

---

基金项目：国家自然科学基金(31660560)；广西农业科学院基本科研业务专项（桂农科 2017YM32）；南宁市科学研究与技术开发计划项目（20133164）[Supported by the Natural Science Foundation of China(31660560); Fundamental Research Program of GXAAS, China (2017YM32); Nanning City Scientific Research and Technology Development Program (20133164)]。

作者简介：张进忠（1979-），男，湖南澧县人，博士研究生，副研究员，从事作物遗传育种研究。(E-mail)jzzhang@foxmail.com

[*] **通信作者：**范燕萍，博士，教授，主要从事植物分子生物学研究，(E-mail)fanyanping@scau.edu.cn。

bulblet and the swelling development of bulblet. It is of great significance to study the genes and explore the regulation of expression pattern for the production of lily bulblet. The key enzyme genes of lily starch synthesis, ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase), granule binding starch synthase (GBSS) and soluble starch synthase (SSS), were cloned by homologous cloning, and the bioinformatics analysis was performed. The bulblets and leaves of lily during the four stages of bulblet swelling development were used to determine the starch content in bulblets at different stages, and the expression of the key genes encoding starch synthesis-related enzymes in the process of bulblet swelling development were analyzed using fluorescence quantitative PCR. The results were as follows: (1) *AGPase* has PLN02241 protein domain belonging to GlgC family protein and ADP_Glucose_PP and NTP_transferase domain belonging to cl11394 family protein. The accession number of *AGPase* gene was KP751443. *GBSS* and *SSS* has Glyco_transf_5, GT1_Glycogen_synthase_DULL1_like conserved domain belonging to cl10013 family protein. The accession number of *GBSS* and *SSS* genes was KP751445 and KP751444, respectively. (2) The starch content showed an increasing trend in the process of the formation and development of lily bulblet swelling. The starch content was up to 44.52% at the stem differentiation stage after bulblet swelling, which was the highest. The three starch synthesis-related genes were up-regulated gradually in bulblets and leaves. The expression of these three starch synthesis-related genes were up to the peak at the stem differentiation stage after bulblet swelling. The expression of *AGPase*, *GBSS* and *SSS* were 10.79, 6.92 and 5.12 in bulblet, and were 6.79, 5.22 and 4.41 in leaves, respectively. The genes expression were much higher in bulblets than in leaves. The results showed that there is a positive correlation between the starch synthesis-related gene expression and the content of starch and bulblet swelling. The finding provides a reference for propagation production of lily bulblet, by which regulates the expression of key synthesis-related genes to promote the swelling development of lily bulblet.

Key words: *Lilium*, starch synthesis, bulblet swelling, AGPase, fluorescence quantitative PCR

百合（*Lilium*）是以鳞茎繁殖的一类植物，按用途可分为观赏百合和药食用百合。我国是药食用百合的主产区，主要品种有兰州百合、龙牙百合和卷丹百合等。生产上百合主要以鳞茎鳞片、茎生小鳞茎、珠芽等方式繁殖，其缺点是繁育周期长，需要完成基叶苗和茎杆苗后才能形成商品种球（赵健等，2017）。兰州百合形成有茎苗需 2~3 a，种植生产需 3 a。因此，通过调控发育来诱导小鳞茎快速膨大，缩短生长周期，对于百合鳞茎种球生产具有重要意义。研究表明，淀粉合成积累促进百合新生鳞茎膨大发育（张进忠等，2016），而淀粉的合成代谢受多个基因调控，其中腺苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶（AGPase）是淀粉合成途径的限速酶，参与淀粉合成的第一步反应，而颗粒结合淀粉合酶（GBSS）和可溶性淀粉合酶（SSS）分别参与直链与支链淀粉的合成（王倩等，2017），影响作物品质。这三类淀粉合成酶对于淀粉的合成具有重要作用，在百合中关于 *AGPase*、*GBSS* 和 *SSS* 基因的克隆及表达分析研究尚未见报道。

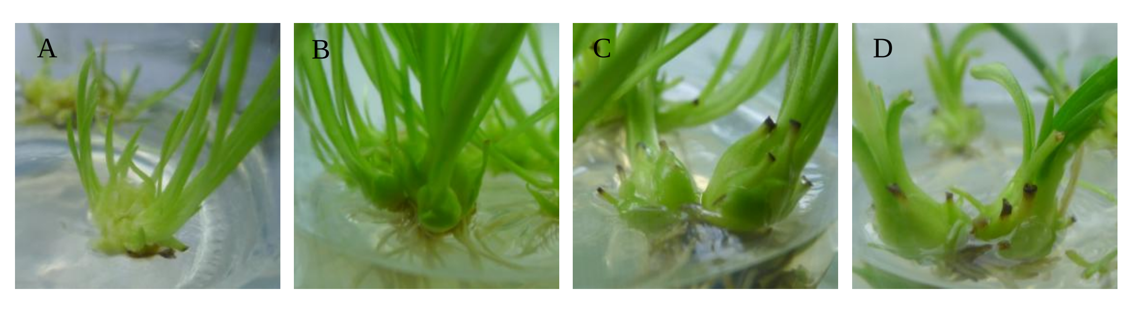
因此，本研究拟克隆百合鳞茎淀粉合成相关酶基因，并针对鳞茎形成膨大发育不同阶段，采用荧光定量 PCR 分析关键酶基因的表达变化，测定百合鳞茎膨大发育中淀粉含量变化，并结合淀粉含量的变化探索淀粉合成关键酶基因表达模式，探索鳞茎种球发育过程中促使其膨大发育的机理。研究结果将为开发鳞茎膨大培育技术提供理论基础，也为百合鳞茎种球生产提供了技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料：兰州百合(*Lilium davidii* var. *unicolor*)组培苗。根据组培过程中鳞茎发育进程将其分为丛生芽阶段，鳞茎形成阶段，鳞茎膨大阶段，鳞茎膨大后茎杆分化阶段，分别标记为 A、B、C、D 四阶段。所取组织材料为各阶段的鳞茎片与叶片材料（图 1），其中阶段 A 鳞茎片材料取自形成鳞茎片的愈伤化组织，取鲜样后液氮速冻置于-80℃冰箱保存。植物材料由广西农业科学院生物技术研究所提供。

主要试剂材料：RNA 提取试剂 Trizol 购于 Invitrogen；逆转录试剂 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 Fermentas；T 载体 pGEM-T 购于 Promega；DNA 凝胶回收试剂盒 AP-GX-50 购于 Axygen；质粒抽提试剂盒 AP-MN-P-50 购于 Axygen；M13 F 引物：TGTAAAACGACGGCCAGT，M13 R 引物：CAGGAAACAGCTATGACC，南京金斯瑞合成。逆转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）购于 TAKARA；荧光定量 PCR 仪：Bio-Rad iQ5。



注：**A**. 丛生芽阶段；**B**. 鳞茎分化阶段；**C**. 鳞茎膨大阶段；**D**. 鳞茎膨大后茎杆分化阶段。下同。

Note：**A**. Cluster bud stage; **B**. Bulblet differentiation stage; **C**. Bulblet swelling stage; **D**. Stem differentiation stage after bulblet swelling. The same below.

图 1 百合不同发育阶段生长的鳞茎

Fig. 1 Differentiation and growth of *Lilium* bulblet in different development stages

1.2 方法

1.2.1 淀粉含量测定，取各发育阶段鲜样品，参照文献（刘襄河等，2013）比色法进行测定。

1.2.2 同源克隆淀粉合成关键酶基因 cDNA 序列

采用同源克隆的方法，根据已经报道的其他作物 *AGPase*、*GBSS* 和 *SSS* 基因 cDNA 序列，首先分别寻找这三个基因的近缘物种完整开放阅读框，然后在 Blastn 上根据此开放阅读框进行比对，将所有相关物种的开放阅读框序列录入，再使用 MegAlign 软件进行整体比对，选择相似性最接近的区域设计简并引物，最终设计可以扩增出百合 *AGPase*、*GBSS* 和 *SSS* 基因的简并引物（表 1）。

采用 Trizol 法提取各组织的 RNA，用 DNase I，RNase-free 去除 RNA 中的 DNA，反转录生成 cDNA 链；利用简并引物进行 PCR 扩增，对扩增片段进行凝胶回收，将片段与 pGEM-T 载体连接，并转化大肠杆菌 TOP10 感受态进行阳性克隆筛选，再对阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定，选取正确的克隆测序。

表 1 设计的 PCR 引物及其序列

Table 1 Primers sequence for PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物功能 Primer function
AGP F	5’- GAKAAYCCHRAYTGGTTYCAGGG-3’	简并引物

AGP R	5’- TCHGTYTCYCTDGCHGCTTCTTG-3’	Degenerate primer
GBSS F	5’-AGATTYGARCCDTGYGGTCTYATYC-3’	
GBSS R	5’-GGDAGRAAAATYAAYTGGATGAA-3’	
SSS F	5’-AARGTBGGDGGYCTDGSTGATGTK-3’	
SSS R	5’- RTTCCADGACCARTCYTGYTSCAT-3’	
18s F	5’-TTCATATCACGTGCTGCATGG -3’	内参基因 Reference gene
18s R	5’-AGACGACTTCGGTGAGACG-3’	
AGP F1	5’-GAGAACCCCAACTGGTTTCAG -3’	荧光定量 PCR Fluorescent quantitative PCR
AGP R1	5’-GGTATCAACCTTCATTGCCTT -3’	
GBSS F1	5’-GGGAGGAAAATCAATTGGATG-3’	
GBSS R1	5’-TGGAATGTCTGGGTCAACAGG-3’	
SSS F1	5’-GCGGCTCTTCAGTTTCTCCTC-3’	
SSS R1	5’-ATCAATCCCATTTATAATGCC-3’	

1.2.3 荧光定量 PCR

利用软件 primer premier 5.0 (Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA)设计基因特异性引物，所用引物序列见表 1。取不同发育阶段（A、B、C 和 D）的鳞片与叶片组织，使用 Trizol 试剂盒抽提细胞 RNA。使用 PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）将 mRNA 逆转录合成 cDNA，合成的 cDNA 用于目的基因表达分析，以 18s rRNA 作为内参，用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒扩增 cDNA 中的各目的基因片段和 18s rRNA，反应程序设置为：95 ℃变性 7 min，95 ℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，40 个循环。每个样品设 3 次重复，计算每个样品目的基因和内参的△Ct，并采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法（Rajeevan et al, 2001）计算各样品中目的基因表达情况。

1.2.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。所有计量结果采用 t 检验，当 $P<0.05$ 说明具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 百合鳞茎不同发育阶段淀粉含量

百合组培鳞茎形成与膨大发育过程中，各阶段淀粉含量呈现递增规律，如表 2 所示，随着鳞茎的膨大发育，其淀粉含量逐渐增加；鳞茎膨大后，鳞茎盘开始分化茎杆（D）时其淀粉含量最高，达到 44.52%，表明鳞茎的膨大与其淀粉含量成正相关，其结果与文献（张进忠等，2016）报道一致。

表 2 百合鳞茎形成发育过程中淀粉含量变化

Table 2 Changes of starch content during the development process of *Lilium*

发育阶段 Development stage	A	B	C	D
淀粉含量 Starch content (%)	17.34 ±0.31 d	30.86 ±0.45 c	40.23 ±0.26 b	44.52 ±0.68 a

注：数值为平均数±标准误。数值后面不同小写字母表示达到显著差异水平（$P<0.05$）。

Note: Values are $\bar{x}$ $\pm s_{\bar{x}}$. Values followed by different letters are significantly difference ($P<0.05$).

2.2 百合淀粉合成关键酶基因 *AGPase*、*SSS* 和 *GBSS* 的 cDNA 克隆

通过对近缘物种相关氨基酸序列 Blast 比对，寻找合适保守区域设计简并引物，分别扩

增 *AGPase*、*SSS* 和 *GBSS* 百合淀粉合成相关酶基因的 cDNA 序列（图 2），分别测序得到 918 bp、567 bp 和 1257 bp 的基因片段长度。经过序列分析及比对，三条序列分别与淀粉合成关键酶基因 *AGP* small subunit、*SSSIII*、*GBSSI*同源性最高，分别达到 100%，99%和 99%。将以上克隆序列上传 NCBI 获得基因登录号：KP751443、KP751445、KP751444。将核苷酸序列翻译成氨基酸序列进行 Blast 比对分析保守结构域，由图 3 可见 *AGPase* 具有 cl28238（GlgC）超级家族中 PLN02241 家族蛋白结构特征及 cl11394 家族蛋白 ADP_Glucose_PP 与 NTP_transferase 结构域；由图 4、图 5 可见，*GBSS* 与 *SSS* 具有 cl10013 家族蛋白 Glyco_transf_5，GT1_Glycogen_synthase_DULL1_like 结构域。

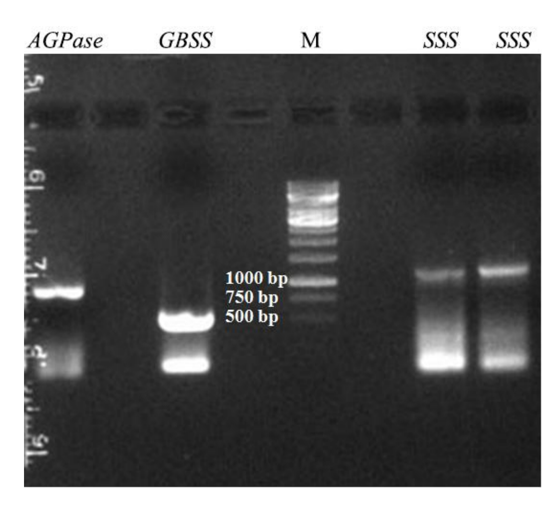


图 2 淀粉合成酶基因片段 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of starch synthase gene fragment

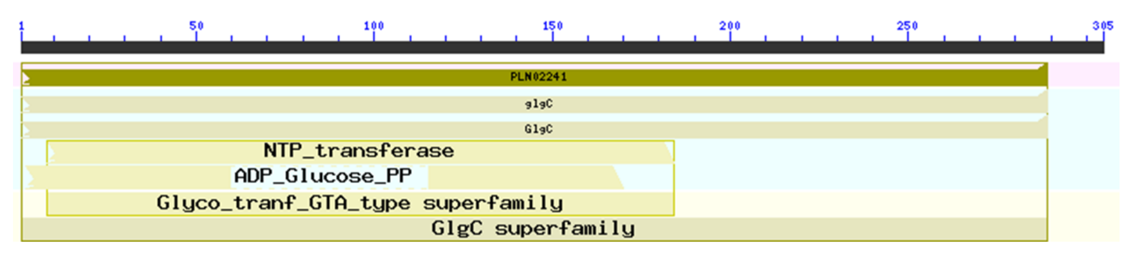


图 3 *AGPase* 保守结构域

Fig. 3 Conserved domain of *AGPase*

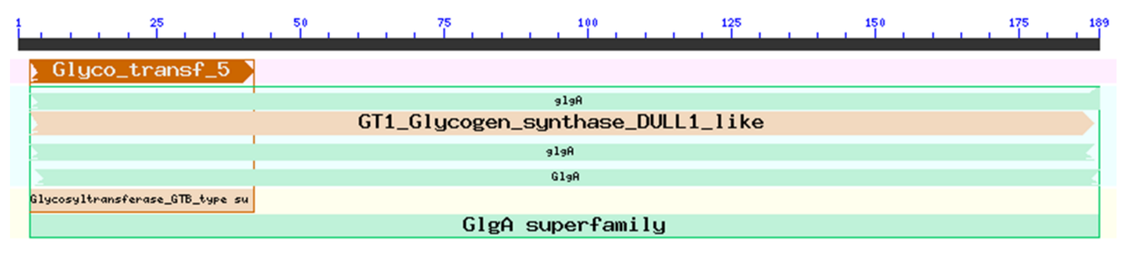


图 4 *GBSS* 保守结构域

Fig. 4 Conserved domain of *GBSS*

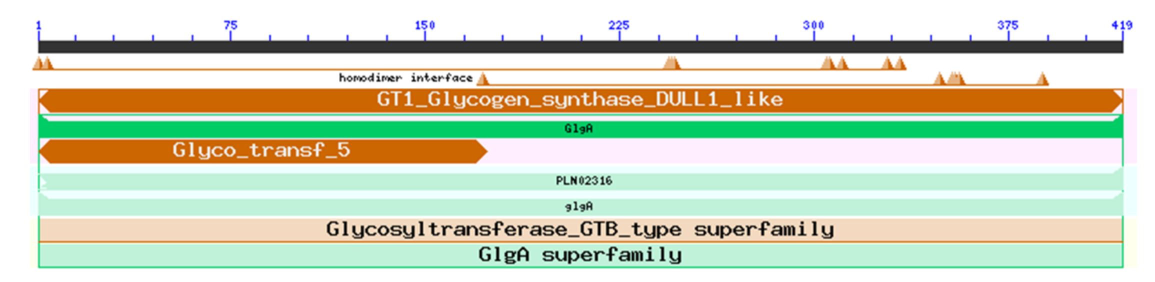


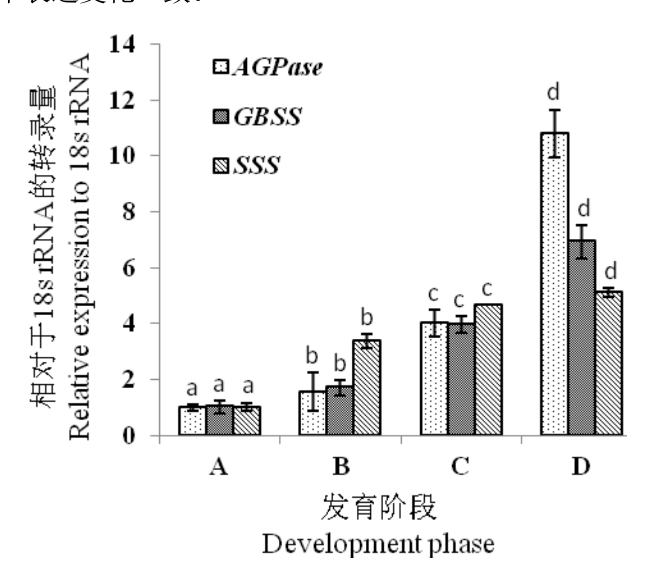
图 5 *SSS* 保守结构域

Fig. 5 Conserved domain of *SSS*

2.3 淀粉合成酶关键基因在百合鳞茎不同发育阶段的表达

图 6 为百合鳞茎从分化形成到膨大发育过程中淀粉合成酶基因的表达情况，阶段 A 中 *AGPase*、*SSS* 和 *GBSS* 三个百合淀粉合成相关酶基因表达量最低，随着鳞茎的膨大发育，各淀粉合成酶基因表达量逐渐增加，并均于发育阶段 D 达到最高。且此三基因在四个发育阶段之间的表达量差异均达显著水平（P<0.05），表达量最大的为阶段 D 中编码淀粉合成限速酶的 *AGPase* 基因，其表达量为 10.79；分别为阶段 A、B、C 的 10.75、6.95、2.69 倍；*GBSS* 在阶段 D 的表达量为 6.92，分别为阶段 A、B、C 的 6.81、4.03、1.75 倍；D 阶段的 *SSS* 表达量为 5.12，分别为阶段 A、B、C 的 5.09、1.51、1.09 倍。三基因的表达量变化与此四个阶段鳞茎淀粉粒形成增多、淀粉含量逐渐递增的表现相关。

图 7 为鳞茎组培膨大发育过程中，叶片中各淀粉合成酶基因的表达情况。叶片中三淀粉合成酶基因表达量随发育进程而逐渐增加，并均于发育阶段 D 达到最高。三基因在四个发育阶段之间的表达量差异均达显著水平（P<0.05），表达量最大的为阶段 D 中 *AGPase* 基因，其表达量为 6.79；同时，阶段 D 中 *GBSS* 和 *SSS* 表达量分别达到 5.23 和 4.41。阶段 D 中 *AGPase* 的表达量为阶段 C、B、A 的 2.18、3.10、6.73 倍；*GBSS* 表达量为阶段 C、B、A 的 1.97、2.45、5.21 倍；*SSS* 表达量为阶段 C、B、A 的 1.74、2.77、4.40 倍；这表明叶片中淀粉合成酶基因表达与鳞茎中表达变化一致。



注：同一基因不同字母表示达到显著差异水平（P<0.05），下同。

Note：Values with different letters show significant difference (P<0.05）in the same item, the same below.

图 6 百合鳞茎中各淀粉合成酶基因在不同发育阶段的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of starch synthase genes in different development stages of *Lilium* bulblets

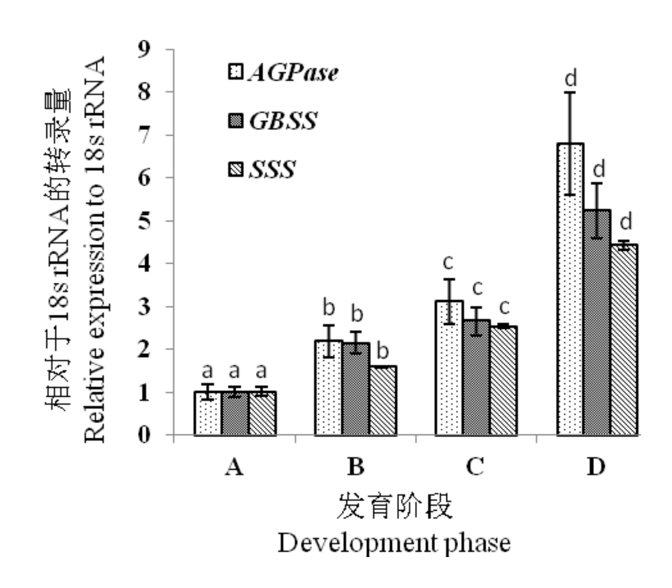


图 7 百合叶片中各淀粉合成酶基因在不同发育阶段的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of starch synthase genes in different development stages of *Lilium* leaf

3 讨论与结论

百合是高淀粉作物，本实验观察到，组培鳞茎的膨大发育涉及到其淀粉含量的急剧变化，鳞茎的膨大发育过程显示了也是淀粉含量增加积累的过程（张进忠等，2016），表明淀粉的合成代谢对于鳞茎种球膨大发育具有积极意义。对于百合鳞茎膨大研究已有相关报道，研究龙牙百合鳞茎膨大发育中，通过适当浓度的外源调节剂芸苔素内酯处理可以提高鳞茎鲜重（仇硕等，2017）；毛百合组培中蔗糖、NAA、IBA、活性炭及多效唑对试管鳞茎形成和膨大都有影响，水杨酸对鳞茎膨大效果不明显（张彦妮等，2016）；在兰州百合组培效鳞茎膨大研究中，活性炭、蔗糖及多效唑对鳞茎的膨大具有促进作用（秦新惠等，2015）；珠芽是百合的一种繁育方式，为茎生小鳞茎，对百合腋生珠芽形成研究发现淀粉和糖代谢及植物激素信号转导通路在珠芽形成中发挥了重要作用，淀粉的合成和积累可促进卷丹珠芽的启动（Yang et al, 2017），可见淀粉合成代谢对鳞茎的形成具有积极意义。

在百合组培鳞茎发育过程中，通过外因诱导（蔗糖、植物生长调节剂）使鳞茎膨大发育，电镜观察发现组培鳞茎膨大与淀粉粒的形成与淀粉含量增加存在正相关（张进忠等，2014）；利用实时荧光定量 PCR 对其主要淀粉合成关键酶基因进行表达分析，以期了解在鳞茎组培发育过程中淀粉合成关键酶基因的表达情况，探索调控基因表达的机理。在 *AGPase* 的时空表达中，结果显示鳞茎种球形成、膨大发育与 *AGPase* 表达正相关，也与淀粉含量正相关（张进忠，2016），在表达部位上其鳞茎与叶片都有表达，鳞茎高于叶片表达，且随发育阶段的时间变化，各表达量变化一致。GBSS、SSS 对直链和支链淀粉合成起主要催化作用（苗红霞等，2016），其表达模式与 AGPase 类似，它们以 AGPase 催化合成的产物为底物延长糖苷链；对 *AGPase* 基因的调控研究通常认为其受激活因子 3-PGA 与抑制因子 Pi 调节（高振宇和黄大年，1998），本研究中所采用的不同发育阶段材料分别为使用了不同浓度蔗糖、植物生长调节剂等外源因子后形成的，此促进鳞茎膨大发育的过程与 *AGPase* 表达增强变化一致，可能存在所采用的外源因子正调控 *AGPase* 基因的表达模式，这对于百合的种球膨大生产具有积极意义，相关研究还需要进一步开展。

参考文献：

GUO Y, DONG L, LIU C, 2012. The relationship between development of bulblet and changes of carbohydrates of pot lily[J]. Henan Agric Sci, 41(5):117-120. [郭燕，董丽，刘春, 2012. 盆栽百合鳞茎发育与碳水化合物变化的关系[J]. 河南农业科学, 41(5):117-120.]

LIU XH, ZHENG LX, ZHENG LM, et al, 2013. Determination of amylose and amylopectin in the commonly used starch materials by dual-wavelength spectrophotometry[J]. Guangdong Agric Sci, 40(18):97-100. [刘襄河，郑丽璇，郑丽勉，等, 2013. 双波长法测定常用淀粉原料中直链淀粉、支链淀粉及总淀粉含量[J]. 广东农业科学, 40(18):97-100.]

MIAO HX, SUN PG, ZHANG KX, et al, 2016. Research progress on expression regulation mechanism of genes encoding granule-bound starch synthase in plants[J]. Biotechnol Bull, 32(3):18-23. [苗红霞，孙佩光，张凯星，等, 2016. 植物颗粒结合淀粉合成酶(GBSS)基因的表达调控机制研究进展[J]. 生物技术通报, 32(3):18-23.]

QIN XH, CUI XL, CHEN XH, et al, 2015. Effect of different factors on bulblet swelling in tissue culture of Lanzhou lily[J]. For Sci Technol, (12):44-47. [秦新惠，崔兴林，陈学红，等, 2015. 不同因子对兰州百合组培小鳞茎膨大的影响研究[J]. 林业科技通讯, (12):44-47.]

QIU S, TANG FL, XIA K, et al, 2017. Propagation culture and bulbs development of *Lilium brownii* var. *viridulum*[J]. Guangdong Agric Sci, 44(4):61-66. [仇硕，唐凤鸾，夏科，等, 2017. 龙牙百合增殖培养及鳞茎生长发育研究[J]. 广东农业科学,44(4):61-66.]

RAJEEVAN MS, RANAMUKHAARACHCHI DG, VERNON SD, et al, 2001. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies[J]. Methods, 25(4):443-451.

WANG Q, SUN WJ, BAO Y, 2017. Evolutionary pattern of the GBSS gene family in plants[J]. Acta Bot Sin, 52(2):179-187. [王倩，孙文静，包颖, 2017. 植物颗粒结合淀粉合酶 GBSS 基因家族的进化[J]. 植物学报, 52(2):179-187.]

YANG PP, XU LF, XU H, et al, 2017. Histological and transcriptomic analysis during bulbil formation in *Lilium lancifolium*[J]. Front Plant Sci, 8:1508.

ZHANG JZ, FAN YP, YU RC, et al, 2014. Regeneration of bulblets from bulb scale explants of LANZHOU lily (*Lilium davidii* var．*unicolor*) and enhancement of bulblet growth[J]. Propag Ornam Plants, 14(3): 112-116.

ZHANG JZ, WEI SL, SUN JM, et al, 2016. Bulblet formation and development of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var．*unicolor*) by tissue culture[J]. Guihaia, 36(3):297-302. [张进忠，韦绍龙，孙嘉曼，等, 2016. 兰州百合组培鳞茎发育研究[J]. 广西植物, 36(3):297-302.]

ZHANG YN, LI ZT, ZHANG YB, et al, 2016. Culture optimization of bulb formation and swelling *in vitro* of *Lilium dauricum*[J]. Jiangsu Agric Sci, 44(4):74-78. [张彦妮，李兆婷，张艳波，等, 2016. 毛百合试管鳞茎形成和膨大的培养优化[J]. 江苏农业科学, 44(4):74-78.]

ZHAO J, ZHAO ZG, TANG FL, et al, 2017. Progress in *Lilium brownie* var. *viridulum*[J]. Guizhou Agric Sci, 45(7):78-81. [赵健，赵志国，唐凤鸾，等, 2017. 龙牙百合的研究进展[J]. 贵州农业科学, 45(7):78-81.]